

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 novembre 2000 (30.11.2000)

PCT

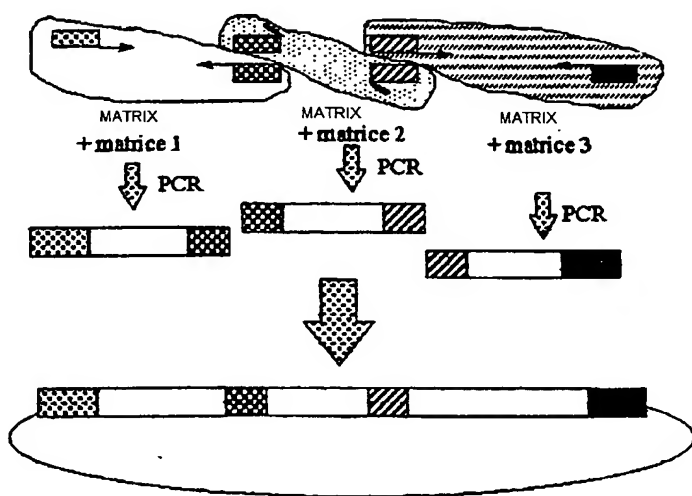
(10) Numéro de publication internationale
WO 00/71730 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/66, C12Q 1/68
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): BIOMETHODES S.A.R.L. [FR/FR]; Génopôle Industries, 4, rue Pierre Fontaine, F-91000 Evry (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01349
- (72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): DELCOURT, Marc [FR/FR]; 1, rue Eugène Varlin, F-94800 Villejuif (FR). BLESA, Stéphane [FR/FR]; 4, allée du Docteur Dupeyroux, F-94000 Créteil (FR).
- (22) Date de dépôt international: 18 mai 2000 (18.05.2000)
- (25) Langue de dépôt: français
- (74) Mandataires: BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).
- (26) Langue de publication: français
- (81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
- (30) Données relatives à la priorité:
99/06419 20 mai 1999 (20.05.1999) FR

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: METHOD FOR INSERTING A NUCLEIC ACID FRAGMENT IN A VECTOR, USES THEREOF AND KITS THEREFOR

(54) Titre: METHODE D'INSERTION D'UN FRAGMENT D'ACIDE NUCLEIQUE DANS UN VECTEUR, SES APPLICATIONS ET LES KITS POUR SA MISE EN OEUVRE



(57) Abstract: The invention concerns a method for inserting a nucleic acid fragment in a vector, consisting in: (a) preparing a double-stranded nucleic acid molecule comprising the nucleic acid fragment to be inserted in a vector and on either side of said fragment a nucleic acid label; (b) performing the denaturation of said nucleic acid molecule and of a cleaved vector whereof the 5' and 3' ends of one of the strands are complementary to said nucleic acid labels; (c) incubating said nucleic acid molecule with the cleaved vector in conditions enabling said nucleic acid labels to be hybridised on the cleaved vector; (d) copying the cleaved vector and the nucleic acid fragment; (e) ligating the newly synthesised strands with the free ends; (f) optionally repeating steps (b) through (e).

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet une méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur, comprenant (a) la préparation d'une molécule d'acide nucléique double brin comprenant le fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur et de part et d'autre dudit fragment un acide nucléique étiquette, (b) la dénaturation de ladite molécule d'acide nucléique et d'un vecteur clivé dont les extrémités 5' et 3' de l'un des brins sont complémentaires desdits acides nucléiques étiquettes, (c) l'incubation de ladite molécule d'acide nucléique avec le vecteur clivé dans des conditions permettant l'hybridation desdits acides nucléiques étiquettes sur le vecteur clivé, (d) la copie du vecteur clivé et du fragment d'acide nucléique, (e) la ligation des brins néosynthétisés avec les extrémités libres, (f) éventuellement la répétition des étapes (b) à (e).

WO 00/71730 A1



IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

MÉTHODE D'INSERTION D'UN FRAGMENT D'ACIDE
NUCLEIQUE DANS UN VECTEUR, SES APPLICATIONS ET LES KITS
POUR SA MISE EN ŒUVRE.

5 La présente invention concerne le domaine de la
biologie moléculaire et se rapporte plus précisément à
l'insertion de fragments d'ADN dans un vecteur plasmidique.

10 L'insertion de fragments d'ADN est la base de
la plupart des manipulations d'ADN effectuées dans les
laboratoires de biologie moléculaire. La stratégie
classique consiste à opérer une réaction de ligation entre
un fragment d'ADN clivé à ses extrémités par des enzymes de
restriction d'une première part, et un plasmide clivé par
les même enzymes de restriction, ou au moins des enzymes de
15 restriction générant des sites compatibles. Ce système
classique implique la présence regroupée de nombreux sites
de restrictions sur chaque plasmide, de façon à pouvoir
intégrer des fragments d'ADN d'extrémités variées.

20 Plus récemment, il a été décrit dans la demande
de brevet international PCT No. WO9206189 une technique de
clonage d'acide nucléique amplifié par PCR. Cette technique
connue sous le nom de "TA-cloning®" (Invitrogen catalogue
97/98 page 54) permet l'insertion de fragments d'ADN
amplifiés par PCR dans un plasmide clivé par une enzyme de
25 restriction libérant à chacune de ses extrémités une
Thymidine 3'-sortante. Cette technique est basée sur le
fait que les produits de PCR contiennent à leur extrémités
une Adénine 3'-sortante. La complémentarité entre le
vecteur-T et le produit de PCR-A permet la ligation
30 efficace de l'un dans l'autre au moyen d'une ligase ou
d'une topoisomérase. Cette technique offre l'avantage
d'être universelle, car tout produit de PCR peut être
inséré dans le vecteur-T, mais elle pose plusieurs
problèmes :

- la fabrication et la conservation de vecteurs-T n'est pas aisée,

5 - l'utilisation de polymérases thermostables contenant une activité exonucléase, qui est nécessaire à l'obtention d'une bonne fidélité lors de l'amplification, n'est généralement pas possible, cette activité éliminant les Adénines 3'-sortantes du produit de PCR,

10 - l'insertion de fragments d'ADN ne se fait pas de façon orientée, et les insertions multiples, successives ou simultanées, sont malaisées.

15 Il a également été décrit dans la demande de brevet international PCT No. WO9222649 une technique de clonage de produits de PCR. Cette technique connue sous le nom de "CLONEAMP®" (Life Technologies catalogue 97/98 page 152) propose d'amplifier un fragment d'ADN par PCR avec des amorces associés à des séquences contenant des dUMP, puis de traiter les produits d'amplification avec l'UDG de façon à obtenir des extrémités 3' compatibles avec un vecteur correspondant.

20 Une technique de clonage utilisant l'hybridation d'un insert simple brin dans un vecteur simple brin, possédant des étiquettes homologues afin que l'un et l'autre puisse s'hybrider, a été décrite dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No. WO
25 91 07505. La technique décrite dans ce document prévoit des étapes de séparation en phase solide des brins du vecteur et de l'insert de façon à obtenir des produits simple brin. Cette étape nécessite l'utilisation d'oligonucléotides couplés à la biotine. Cette forme de mise en œuvre
30 complique la technique et limite son intérêt par rapport aux autres techniques de clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur.

35 La présente invention a précisément pour objet une nouvelle méthode d'insertion d'un fragment d'acide

nucléique dans un vecteur, qui est universelle et indépendante de la compatibilité entre sites de restrictions. La méthode de l'invention permet par ailleurs de construire des banques d'ADN complémentaire orientées, et offre la possibilité d'isoler de façon aisée des parties 5' de séquences d'ADN dont on connaît la partie 3'.

La méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) on prépare une molécule d'acide nucléique double brin comprenant le fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur, et en 5' dudit fragment un premier acide nucléique étiquette comprenant une séquence nucléique complémentaire de l'extrémité 5' d'un des brins d'un vecteur clivé, et en 3' dudit fragment un second acide nucléique étiquette comprenant une séquence nucléique complémentaire de l'extrémité 3' du même brin dudit vecteur clivé,

b) on dénature d'une part ladite molécule d'acide nucléique et d'autre part un vecteur clivé dont les extrémités 5' et 3' de l'un des brins sont complémentaires desdits premier et second acides nucléiques étiquettes,

c) on incube ladite molécule d'acide nucléique avec le vecteur clivé dont les extrémités 5' et 3' sont complémentaires des premier et second acides nucléiques étiquettes, dans des conditions permettant l'hybridation desdits premier et second acides nucléiques étiquettes sur le vecteur clivé,

d) on copie :

- d'une part, le vecteur clivé dans le sens 5' vers 3' à partir de l'extrémité 3' du second acide nucléique étiquette hybridé à l'extrémité 3' du vecteur clivé, et

- d'autre part, le fragment d'acide nucléique dans le sens 5' vers 3' à partir de l'extrémité 3' du vecteur clivé,

e) éventuellement et de préférence, on
5 ligature :

- d'une part, l'extrémité 3' du brin néosynthétisé avec comme matrice le vecteur, avec l'extrémité 5' du premier acide nucléique étiquette hybridé à l'extrémité 5' du vecteur clivé, et

10 - d'autre part, l'extrémité 3' du brin néosynthétisé avec comme matrice le fragment à insérer, avec l'extrémité 5' du vecteur clivé,

f) éventuellement on répète les étapes (b) à (e),

15 g) éventuellement, on transforme un hôte cellulaire pour sélectionner les vecteurs ayant intégré le fragment d'acide nucléique. Cette étape de transformation d'un hôte, par exemple dans des bactéries compétentes, si elle n'est qu'éventuelle, est toutefois hautement
20 préférable.

Une représentation schématique des étapes de la méthode de l'invention est donnée à la figure 4 en annexe.

25 La molécule d'acide nucléique comprenant le fragment d'acide nucléique à intégrer dans un vecteur est préparée par amplification dudit fragment par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir de deux oligonucléotides amorces. Comme représenté à la figure 1 en annexe, chacun de ces oligonucléotides est composé de deux
30 parties :

- une partie en 3' homologue à une partie du fragment à insérer.

- une partie en 5', constituant l'acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique
35 homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

Avantageusement, chaque acide nucléique étiquette présente les caractéristiques suivantes :

- La séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé est caractérisée en ce qu'elle est complémentaire d'une séquence du vecteur bordée par une Thymidine (T) en 3'. En d'autres termes, la séquence de l'extrémité clivée du vecteur qui est complémentaire de ladite séquence nucléique homologue de l'acide nucléique étiquette est bordée sans la contenir par une Thymidine (T) en 3'. La position de cette Thymidine (T), par son homologie avec une Adénine (A), ajoutée lors l'étape (c) du procédé de l'invention, permet d'éviter d'éventuels problèmes de mésappariements.

- L'extrémité 3' de la séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé est caractérisée en ce que :

. soit elle se termine au niveau du dernier nucléotide dudit vecteur clivé, et alors l'acide nucléique étiquette est constitué seulement de ladite séquence homologue à l'extrémité du vecteur clivé,

. soit elle est plus longue d'au moins un nucléotide que la séquence qui lui est homologue, et alors l'acide nucléique étiquette est constitué de ladite séquence homologue à l'extrémité du vecteur clivé, prolongé en 3' d'au moins un nucléotide.

En conséquence, le procédé de l'invention est caractérisé en ce que à l'étape (a) on prépare une molécule d'acide nucléique comprenant :

- le fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur,

- de part et d'autre dudit fragment, une molécule d'acide nucléique étiquette constituée d'une séquence nucléique, de l'ordre de 10 à 150 nucléotides et de préférence de l'ordre de 15 à 100 nucléotides, homologue

à l'une des extrémités d'un vecteur clivé, ladite séquence
nucléique homologue étant éventuellement séparée du
fragment d'acide nucléique à intégrer par au moins un
nucléotide et de préférence entre 1 et de l'ordre de 130
5 nucléotides.

De préférence, la séquence nucléique homologue
de l'extrémité du vecteur clivé comprise dans l'acide
nucléique étiquette est caractérisée en ce qu'elle est
complémentaire d'une séquence du vecteur bordée par une
10 Thymidine (T) en 3'.

Avantageusement, chaque séquence nucléique
homologue d'une extrémité du vecteur clivé, comprise dans
l'acide nucléique étiquette est suffisamment homologue pour
s'hybrider à ladite extrémité du vecteur clivé à une
15 température comprise entre 30 et 90°C, de préférence entre
30 et 70°C et tout préférentiellement à une température de
50°C.

Un exemple d'un acide nucléique étiquette selon
l'invention, hybridé à l'extrémité d'un vecteur clivé, est
20 représenté à la figure 2 en annexe. Sur cette figure, on a
représenté en gras :

- la base T qui borde l'extrémité du vecteur
clivé complémentaire de la séquence nucléique homologue de
l'acide nucléique étiquette, et
- 25 - la base G qui sépare le fragment d'acide
nucléique à insérer de la séquence nucléique homologue du
vecteur clivé.

Tous les vecteurs notamment plasmidiques
30 contenant avantageusement un marqueur de résistance à un
antibiotique peuvent être utilisés dans la méthode de
l'invention. Le vecteur choisi doit être clivé au niveau
d'un ou de deux sites de restriction, de façon à être
linéarisé. Dans le cas où le vecteur est clivé au niveau de
35 deux sites de restriction, différents ou identiques, le

petit fragment libéré lors de ce clivage doit être éliminé par purification du vecteur linéaire par tout moyen connu de l'homme du métier, comme par exemple une purification sur gel d'agarose, sur colonne de Séphacryl.

5

Les étapes de copie (d) et de ligation éventuelle (e) de la méthode de l'invention, également désignées conjointement ci-après "réaction combinée" ou "réaction combinée en chaîne", consiste à soumettre, après
10 la dénaturation de l'étape (b) et l'hybridation de l'étape (c) la molécule d'acide nucléique préparé à l'étape (a) et le vecteur clivé, à l'action d'une polymérase et d'une ligase thermostables, puis, avantageusement, à renouveler les étapes (b) à (e) selon une série de cycles de
15 température. Les étapes (d) et (e) peuvent être réalisées soit successivement soit sensiblement simultanément après les étape de dénaturation puis d'hybridation.

La réaction combinée permet à la fois :

- la répllication totale du vecteur clivé à
20 partir d'une amorce constituée de l'extrémité 3' de la molécule d'acide nucléique préparée à l'étape (a), puis la ligation simple brin de l'extrémité 3' nouvellement générée sur l'extrémité 5', phosphorylée, de la molécule d'acide nucléique ayant servi d'amorce.

25 - la répllication du fragment d'acide nucléique à partir d'une amorce constituée par l'extrémité du vecteur clivé, puis ligation simple brin de l'extrémité nouvellement générée sur l'extrémité 5', phosphorylée, du vecteur de la molécule d'acide nucléique.

30

L'étape de ligation peut être supprimée, car elle est susceptible de s'effectuer naturellement, après transformation, par les ligases des bactéries. Toutefois, l'absence de ligase thermostable dans la réaction est
35 associée à une efficacité de clonage plus faible.

La synthèse par une polymérase thermostable d'un brin représentant la taille complète du vecteur peut être difficile à réaliser, aussi, selon une forme préférée de mise en œuvre de la méthode de l'invention, l'étape (d) est effectuée en présence de relais, c'est à dire des oligonucléotides phosphorylés homologues de différentes parties du vecteur répartis de façon homogène sur chacun des deux brins du plasmide, à une distance entre eux de 500 à 2000 paires de bases.

Comme indiqué précédemment la molécule d'acide nucléique comprenant le fragment d'acide nucléique à intégrer dans un vecteur est préparée à l'étape (a) par amplification dudit fragment par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir de deux oligonucléotides amorces, chacun composé de deux parties :

- une partie 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer.

- une partie 5', constituant l'acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

Avantageusement, la partie 3' de chaque oligonucléotide amorce comprend de 5 à 20 nucléotides dont la séquence est suffisamment homologue à celle de chacune des extrémités du fragment d'ADN pour s'hybrider à ladite extrémité à une température comprise entre 30 et 90°C, et de préférence environ 50°C.

Comme indiqué précédemment, chaque acide nucléique étiquette entrant dans la constitution des oligonucléotides amorces comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé qui est complémentaire d'une séquence du vecteur bordée par une Thymidine (T) en 3'.

Egalement comme indiqué précédemment, chaque acide nucléique étiquette entrant dans la constitution des oligonucléotides amorces comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé, dont l'extrémité 3' :

- soit se termine au niveau du dernier nucléotide dudit vecteur clivé, et alors l'acide nucléique étiquette est constituée seulement de ladite séquence homologue à l'extrémité du vecteur clivé,

- soit est plus longue d'au moins un nucléotide que sa séquence homologue, et alors l'acide nucléique étiquette est constituée de ladite séquence homologue à l'extrémité du vecteur clivé, prolongé en 3' d'au moins un nucléotide.

Ainsi, chaque acide nucléique étiquette entrant dans la constitution des oligonucléotides amorces est constitué d'une séquence nucléique, de l'ordre de 10 à 150 nucléotides et de préférence de l'ordre de 15 à 100 nucléotides, homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé, ladite séquence nucléique homologue étant éventuellement séparée de la partie en 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer par au moins un nucléotide et de préférence entre 1 et de l'ordre de 130 nucléotide.

Avantageusement, chaque acide nucléique étiquette entrant dans la constitution des oligonucléotides amorces comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé qui est suffisamment homologue pour s'hybrider à ladite extrémité du vecteur clivé à une température comprise entre 30 et 90°C, de préférence entre 30 et 70°C et tout préférentiellement à une température de 50°C.

L'invention concerne donc aussi les oligonucléotides constituant des amorces pour la préparation par PCR d'une molécule d'acide nucléique

contenant un fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur clivé, susceptible d'être utilisés dans la méthode décrite précédemment. Un tel oligonucléotide est composé de deux parties :

5 - une partie en 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer,

 - une partie en 5', constituant un acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

10 la partie 3' d'un tel oligonucléotide comprend de 5 à 20 nucléotides dont la séquence est suffisamment homologue à celle d'une extrémité du fragment d'acide nucléique pour s'hybrider à ladite extrémité à une température comprise entre 30 et 90°C, et de préférence
15 environ 50°C.

 La partie 5' constituant l'acide nucléique étiquette d'un tel oligonucléotide comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité d'un vecteur clivé qui est complémentaire d'une séquence du vecteur bordée par une
20 Thymidine (T) en 3'.

 La partie 5' constituant l'acide nucléique étiquette d'un tel oligonucléotide est avantageusement constituée d'une séquence nucléique, de l'ordre de 10 à 150 nucléotides et de préférence de l'ordre de 15 à 100
25 nucléotides, homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé, ladite séquence nucléique homologue étant éventuellement séparée de la partie en 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer par au moins un nucléotide et de préférence entre 1 et de l'ordre de 130 nucléotide.

30 La partie 5' constituant l'acide nucléique étiquette d'un tel oligonucléotide comprend de préférence une séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé qui est suffisamment homologue pour s'hybrider à ladite extrémité du vecteur clivé à une température

comprise entre 30 et 90°C, de préférence entre 30 et 70°C et tout préférentiellement à une température de 50°C.

L'invention concerne aussi une paire d'amorces utile pour une réaction d'amplification par PCR d'un
5 fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur clivé constituée de deux oligonucléotides précédents, ainsi que le produit d'amplification obtenu par une réaction PCR mise en œuvre avec ladite paire d'amorces. Un tel produit d'amplification est plus particulièrement celui préparé à
10 l'étape (a) du procédé de l'invention, constituée d'une molécule d'acide nucléique double brin comprenant le fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur, et en 5' dudit fragment un premier acide nucléique étiquette comprenant une séquence nucléique complémentaire de
15 l'extrémité 5' d'un des brins d'un vecteur clivé, et en 3' dudit fragment un second acide nucléique étiquette comprenant une séquence nucléique complémentaire de l'extrémité 3' du même brin dudit vecteur clivé,

20 La méthode de l'invention est remarquable en ce qu'elle peut être utilisée pour insérer dans un vecteur un fragment d'acide nucléique inconnu ou hétérogène, par exemple dans le cas de la préparation de banques d'ADN. Un tel fragment d'acide nucléique ne peut être facilement
25 amplifié par PCR en utilisant des oligonucléotides flanquants. Il est alors possible à l'étape (a) de préparer une molécule d'acide nucléique comprenant à l'une de ses extrémités un adaptateur constitué par les première et seconde d'acide nucléique étiquette. Un exemple de
30 préparation d'une molécule d'ADNc ayant des adaptateurs est représenté à la figure 3. Ces adaptateurs peuvent être ligués sur le fragment d'acide nucléique à insérer dans le vecteur par toute méthode connue de l'homme du métier.

La méthode de l'invention est également utile
35 pour la recherche des extrémités 5' d'une séquence d'acide

nucléique. Dans ce cas on utilise pour la préparation de la molécule d'acide nucléique de l'étape (a) deux oligonucléotides composés chacun de deux parties :

- 5 - une partie en 3' dégénérée de façon à être homologue de plusieurs séquences d'acides nucléiques, et
- une partie en 5', désignée précédemment acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

10 Afin d'augmenter le rendement de l'insertion du fragment d'acide nucléique dans le vecteur, la méthode de l'invention comprend la répétition des étapes :

- b) dénaturation,
- c) hybridation,
- 15 d) copie,
- e) ligation éventuelle,
- définissant un cycle de température correspondant chacune à la réaction considérée.

20 La méthode de l'invention trouve de nombreuses applications comme bien entendu le sous-clonage de fragments d'ADN obtenus par PCR, ou encore par exemple la construction de banques d'ADNc, la recherches d'extrémités 5' de gènes partiellement clonés, et la construction de

25 combinaisons moléculaires complexes.

 L'invention concerne aussi un kit pour la mise en œuvre de la méthode de l'invention. Un tel kit comprend les produits suivants, proposés séparément ou sous forme de

30 mélange :

- un vecteur plasmidique clivé dans son polylinker au niveau d'un ou de préférence de deux sites non compatibles,
- une série d'oligonucléotides relais
- 35 complémentaires de régions du vecteur,

- un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable,

5 - une polymérase thermostable possédant de préférence une activité exonucléasique additionnelle,

- une ligase thermostable,

- une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides.

10 - éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

L'invention concerne également un kit pour la fabrication de banques d'ADNc mettant en œuvre la méthode d'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur décrite précédemment. Il s'agit par exemple de construire une banque
15 d'ADNc intégré dans un plasmide, par exemple pBM.1, à partir d'ARN messager isolé d'une lignée cellulaire ou d'un tissu. Un tel kit est composé des produits suivants, proposés séparément ou sous forme de mélange :

20 - un vecteur plasmidique, clivé dans son polylinker au niveau d'un ou de préférence de deux sites non compatibles,

- une série d'oligonucléotides relais complémentaires de régions du vecteur,

25 - un oligonucléotide nécessaire à la synthèse du premier brin,

- deux oligonucléotides homologues à chacun des brins de l'une des extrémités du vecteur clivé, susceptibles d'être ajoutés en tant qu'adaptateurs à l'ADNc une fois celui-ci synthétisé,

30 - un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable,

- une polymérase thermostable possédant de préférence une activité exonucléasique additionnelle,

35 - une ligase thermostable,

- une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides.

- éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

5

La méthode de l'invention est également utile pour la recherche des extrémités 5' d'une séquence d'acide nucléique. Un kit pour la mise en œuvre de la méthode de l'invention dans cette application est composé des produits suivants, proposés séparément ou sous forme de mélange :

10

- un vecteur plasmidique, clivé dans son polylinker au niveau d'un ou de préférence de deux sites non compatibles,

15

- une série d'oligonucléotides relais complémentaires de régions du vecteur,

- deux oligonucléotides composés chacun de deux parties :

- une partie en 3' dégénérée de façon à être homologue de plusieurs séquences d'acides nucléiques, et

20

- une partie en 5', désignée précédemment acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

- un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable,

25

- une polymérase thermostable possédant de préférence une activité exonucléasique additionnelle,

- une ligase thermostable,

- une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides.

30

- éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

35

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent qui se

rapportent la préparation de molécule d'acide nucléique comprenant le fragment d'acide nucléique à insérer, et à des applications de la méthode de l'invention :

- 5 - insertion simple d'un produit de PCR,
- préparation d'une construction complexe,
- sous-clonage de mutants obtenus par PCR chevauchantes,
- fusion de protéine,
- cas d'une PCR utilisant des oligonucléotides
- 10 dégénérés,
- insertion d'une banque d'ADNc dans le plasmide pBM.1.

15 Exemple 1 : Préparation de molécule d'acide nucléique comprenant le fragment d'acide nucléique à insérer.

 Le segment d'ADN de séquence connue est inséré dans le plasmide par PCR en utilisant des oligonucléotides amorces constitués en deux parties tels que décrits

20 précédemment. La qualité de cette amplification peut être vérifiée en faisant migrer une partie du produit de PCR sur un gel d'agarose, et en observant la présence d'une bande d'ADN à la taille attendue. Pour éviter tout risque d'interférence des oligonucléotides résiduels lors des

25 étapes ultérieures, il peut être nécessaire de purifier le produit de PCR par l'une des techniques classiques de purification sur gel ou sur colonne de séphacryl, etc...

 Dans un autre mode de mise en œuvre de la

30 méthode de l'invention, les fragments d'ADN à insérer sont des ADNc, fabriqués à partir d'ARNm, de séquences inconnues. Dans ce cas des adaptateurs oligonucléotidiques peuvent leur être ajoutés de telle sorte qu'un des adaptateurs est homologue à l'une des extrémités du

35 plasmide dans lequel est inséré chacun de ces fragments

d'ADN, et le second adaptateur est homologue à l'autre extrémités du plasmide dans lequel est inséré chacun de ces fragments d'ADN.

5 La seconde étape consiste à effectuer une réaction combinée en utilisant comme matrice fractionnée d'une part le vecteur clivé comme décrit précédemment, et d'autre part le produit de PCR. On ajoute à cette matrice, les enzymes nécessaires à l'activité recherchée, polymérase
10 thermostable contenant une exonucléase et ligase thermostable, leurs tampons et substrats, ainsi qu'une série d'oligonucléotides phosphorylés complémentaires en plusieurs points du plasmide, destinés à servir de relais lors de la réaction combinée, l'efficacité de cette
15 activité décroissant fortement avec la longueur du brin à synthétiser.

Un exemple de mélange de réaction est le suivant :

| | | |
|----|------------------------------------|----------|
| | Produit de PCR | 5 µl |
| 20 | Vecteur clivé purifié (100 ng/µl) | 1 µl |
| | Vent Polymérase (5 U) | 0,5µl |
| | Tth ligase (40 U) | 0,5 µl |
| | Tampon 10X Taq Pol | 1,25 µl |
| | Tampon 5X Tth Ligase | 2,5 µl |
| 25 | Mélange de relais 12 x 5 pmoles/µl | 2 µl |
| | dNTP 2,5 nmoles / µl | 0,5 µl |
| | Eau désionisée | 11,75 µl |
| | <hr/> | |
| | Total | 25 µl |

30

Le mélange est ensuite soumis à une série de cycle de température, tels que [(94°, 1') ; (50°, 1') ; (72°, 5')].

A l'issue de cette réaction combinée, tout ou partie du mélange de réaction est directement transformé en bactéries compétentes en utilisant l'une des techniques classiques de transformation. Les bactéries sont ensuite
5 étalées sur un milieu solide contenant le milieu sélectif correspondant au gène de résistance du plasmide employé.

Après une période d'incubation adéquate, les colonies bactériennes sont individuellement examinées soit par minipréparation d'ADN plasmidique soit,
10 avantageusement, par PCR sur colonies. La présence d'un insert correspondant à la taille attendue est alors détectée par migration électrophorétique de l'ADN sur gel d'agarose.

15 Exemple 2 : Insertion simple d'un produit de PCR.

Cet exemple correspond à l'utilisation la plus simple de la méthode de l'invention. Dans cet exemple, une
20 grande quantité d'un vecteur plasmidique est préparée de telle sorte à pouvoir être utilisée dans le cadre de la présente technique, et pourra ainsi être utilisée pour un grand nombre d'insertion de fragment d'ADN indépendants. Cet exemple s'adapte parfaitement à la réalisation de kits
25 de clonage de fragment d'ADN, notamment obtenu après une amplification par PCR.

1) Préparation du vecteur.

pBM.1 est un vecteur plasmidique d'une taille
30 de 4 kb.

Un microgramme de ce plasmide est simultanément digéré par les deux enzymes de restriction XhoI et EcoRI, dont des sites uniques sont présents au niveau du polylinker du plasmide, dans des conditions standard.

Ce produit de digestion est ensuite purifié en utilisant une colonne de Séphacryl, de façon éliminer du mélange les petits fragments issus de la double digestion, potentiellement nuisibles. La préparation plasmidique est ensuite ajustée à 100 ng/µl.

2) Choix des oligonucléotides.

Les séquences des amorces nécessaires à l'amplification par PCR du gène à insérer dans le plasmide et les séquences des deux extrémités du plasmide pBM.1 clivé par XhoI et EcoRI étant connues, la séquence des oligonucléotides à employer dans le cadre de la présente invention peut être déterminée.

La partie 3' de ces oligonucléotides est fixée par la séquence du fragment d'ADN à insérer. Dans le présent exemple, il s'agit du gène de résistance à l'ampicilline, présent sur le plasmide SK+ (Catalogue Stratagene 97/98 p312), entre deux oligonucléotides distants d'environ 700 bases l'un de l'autre, et antiparallèles.

La partie 5' de ces oligonucléotides est fixée par la séquence des extrémités du plasmide pBM.1 clivé, et est en outre définie par le fait qu'elle débordé cette extrémité (de un nucléotide dans l'exemple présent), et que le premier nucléotide en amont du site de sa liaison sur sa séquence complémentaire est préférentiellement une thymidine. Deux parties 5' distinctes sont définies, l'une étant complémentaire de l'extrémité XhoI du vecteur, l'autre de son extrémité EcoRI.

La partie 5' XhoI a été associée à la partie 3' AmpA de façon à obtenir un oligonucléotide d'environ 40 bases, et nommé FF32. La partie 5' EcoRI a été associée à la partie 3' AmpB de façon à obtenir un oligonucléotide d'environ 40 bases, et nommé FF34.

3) Réaction de PCR.

Une réaction de PCR est réalisée en utilisant le plasmide SK+ et les oligonucléotides FF32 et FF34. Vingt-cinq cycles de température [(94°, 1') ; (50°, 1') ; (72°, 1')] sont effectués en présence de 5 unités de polymérase Vent (New England Biolabs) et des concentrations en ions et en dNTP compatibles avec l'activité de cette enzyme.

L'efficacité de cette réaction de PCR est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose d'une partie du produit de cette réaction.

4) Réaction combinée en chaîne.

Une réaction combinée en chaîne est réalisée selon le protocole suivant :

| | |
|------------------------------------|----------|
| Produit de PCR | 5 µl |
| pBM.1 clivé et purifié (100 ng/µl) | 1 µl |
| Vent Polymérase (5 U) | 0,5µl |
| Tth ligase (40 U) | 0,5 µl |
| Tampon 10X Taq Pol | 1,25 µl |
| Tampon 5X Tth Ligase | 2,5 µl |
| Mélange de relais 12 x 5 pmoles/µl | 2 µl |
| dNTP 2,5 nmoles / µl | 0,5 µl |
| Eau désionisée | 11,75 µl |
| Total | 25 µl |

Ce mélange de réaction est soumis à 12 cycles de température [(94°, 1') ; (50°, 1') ; (72°, 5')].

5) Transformation du produit de réaction combinée.

Dix microlitres de ce mélange de réaction sont prélevés et transformés dans des bactéries compétentes de

la souche DH10B en utilisant un protocole classique de transformation par choc thermique.

Le mélange de transformation est ensuite étalé sur une boîte de petri supportant un milieu solide contenant une concentration optimale de Kanamycine, et incubées au moins 16 heures.

6) Examen individuel des colonies.

Vingt-quatre des colonies bactériennes présentes sur la boîte de petri à l'issue de l'incubation sont prélevées et testées pour la présence d'un insert au niveau du polylinker par la technique de la PCR sur colonies, en utilisant des oligonucléotides flanquants. La détection d'inserts au niveau du polylinker se fait par électrophorèse des produits de PCR sur colonies.

Les résultats de cette électrophorèse permettent d'identifier 11 colonies sur 24 contenant un insert au niveau du polylinker.

Le séquençage complet de l'insert présent au niveau de deux de ces colonies bactériennes confirme que l'insertion du fragment d'ADN en utilisant la technique de l'invention s'est déroulée sans ajout ni retrait de nucléotides au niveau des jonctions.

25 Exemple 3 : Préparation d'une construction complexe.

Cet exemple fait référence au précédent, mais en diffère en ce que, à l'étape 2), six oligonucléotides sont déterminés de façon à obtenir une construction composée de trois fragments de PCR amplifiés de telle sorte que leurs extrémités soient homologues deux à deux comme montré sur la représentation schématique donnée à la figure 5 en annexe).

La troisième étape du protocole est dans cet exemple constitué de trois PCR indépendantes effectuées avec trois paires d'oligonucléotides et trois matrices différentes, comme montré à la figure 5 en annexe.

5 Cinq microlitres de chacun de ces trois produits de PCR sont mélangés, et les autres réactifs nécessaires à effectuer la réaction combinée telle que décrite dans l'exemple précédent leur sont ajoutés.

10 Le protocole est ensuite identique à celui de l'exemple précédent. 30% des colonies examinées contiennent un insert composé de la succession des trois fragments de PCR telle qu'explicitée à la figure 5.

15 Exemple 4 : Sous-clonage de mutants obtenus obtenus par PCR chevauchantes.

20 Une technique de mutagenèse utilisée par un grand nombre de laboratoires implique la réalisation de deux produits de PCR, dont les extrémités sont homologues et constituées par un oligonucléotide contenant la mutation désirée. Dans un deuxième temps, les deux produits de PCR sont traditionnellement utilisés comme matrice dans une seconde réaction de PCR, chevauchante au niveau des extrémités homologues, et en utilisant des oligonucléotides
25 flanquant l'ensemble. Ce grand produit de PCR est ensuite sous-cloné dans un plasmide.

30 La méthode de l'invention présente une amélioration de cette technique, permettant de grouper les étapes de PCR chevauchante et de sous-clonage. Cet exemple est proche des deux précédents, et respecte l'ordre et la composition de leurs étapes.

35 Toutefois, dans la seconde étape, le choix des oligonucléotides fait intervenir, outre les deux oligonucléotides décrits dans l'exemple 3, deux oligonucléotides internes au fragment à muter, contenant la

mutation désirée, et complémentaires, nommés ici MutA et MutB (figure 6).

5 Dans la troisième étape, deux réactions de PCR sont effectuées en utilisant comme matrice le fragment d'ADN dans lequel introduire une mutation, la première au moyen des oligonucléotides FF32 et MutA, la seconde au moyen des oligonucléotides FF34 et MutB.

10 Dans la quatrième étape, les deux produits de PCR sont mélangés, et ce mélange est complété de façon à être le support d'une réaction combinée, selon le protocole décrit dans les premier et second exemples.

La suite du protocole est identique, et permet l'obtention directe du fragment d'ADN muté sous-cloné dans le plasmide pBM.1.

15

Exemple 5 : Fusion de protéine.

Dans cet exemple, on cherche à fusionner sans disruption de phase codante, deux domaines de deux protéines différentes. La construction d'ADN doit donc se faire au nucléotide près, ce qui est difficile à réaliser par des techniques autres que celle de la présente invention.

25 Le gène codant pour la protéine X est cloné dans le vecteur pBM.1, l'ensemble étant dans la suite appelé pBM.1-X. Le gène codant pour la protéine Y n'est pas inséré dans le plasmide pBM.1.

1) Préparation du vecteur.

30 Le vecteur pBM.1-X est clivé d'une première part au niveau du site unique de restriction le plus proche du site de jonction, l'enzyme de restriction utilisée étant dans la suite appelée enz1. D'une seconde part, ce vecteur est clivé au niveau du site du polylinker tel que le fragment du gène de la protéine X à éliminer soit borné par

35

les deux sites de clivage. L'enzyme de restriction utilisée pour ce second clivage est baptisée enz2.

Le vecteur est ensuite isolé de la partie du gène A à éliminer par purification sur gel, en utilisant
5 l'une ou l'autre des multiples technique de purification de l'ADN à partir de la bande d'agarose.

2) Choix des oligonucléotides.

Les deux oligonucléotides utilisés dans cet
10 exemple sont chacun constitués de deux parties. Leur partie 3' permet l'amplification du fragment d'ADN désiré en utilisant le gène de la protéine Y comme matrice. Leurs extrémités 5' sont homologues aux extrémités du vecteur pBM.1-X Enz1 Enz2.

15 Le schéma de la jonction enz2 est comparable aux jonctions décrites dans le second exemple.

La jonction enz1 est légèrement différente, en ce que la jonction entre le gène de la protéine X et celui de la protéine Y, tel que préalablement déterminé, peut se
20 situer à une distance nucléotidique relativement plus importante que dans le cas de l'exemple 2. Cette distance est comblée par l'oligonucléotide utilisé. Ainsi, le second oligonucléotide pourra contenir jusqu'à cent nucléotides, nécessaires à effectuer la jonction entre X et Y d'une
25 part, et la position du site enz1 d'autre part.

A la troisième étape, la PCR est réalisée en utilisant les deux oligonucléotides tels que décrits précédemment, l'un étant potentiellement beaucoup plus long que l'autre. Hormis cette particularité, cette étape se
30 déroule sensiblement pareillement à la troisième étape du deuxième exemple.

Les quatrième, cinquième et sixième étapes se déroulent d'une façon comparable aux étapes correspondantes dans l'exemple 2.

Exemple 6 : Cas d'une PCR utilisant des oligonucléotides dégénérés.

5 Dans cet exemple, deux oligonucléotides, chacun
composé de deux parties, sont utilisés, d'une façon
analogue à celle décrite dans l'exemple 2. La différence
majeure réside dans le fait que la partie 3' de l'un de ces
deux oligonucléotides est dégénérée, c'est à dire qu'elle
10 contient une série de 5 à 40, et de préférence environ 20
nucléotides aléatoirement constitués à certaines de ses
positions, ou à chacune, d'un mélange des quatre
nucléotides.

Cet exemple s'adapte notamment au cas où un
expérimentateur connaît la séquence d'une partie seulement
15 d'un gène, et où il cherche à isoler la partie qui ne lui
est pas encore connue. Cet exemple s'adapte plus
particulièrement au cas où un expérimentateur a déjà isolé
et séquencé la partie 3' d'un gène par exemple après
criblage d'une banque d'ADNc, cherchant alors à isoler la
20 partie 5' de ce même gène.

1) Préparation du vecteur.

La première étape est identique à celle de
l'exemple 2.

25

2) Choix des oligonucléotides.

Deux oligonucléotides constitués chacun de deux
parties doivent être déterminée. Leurs parties 5' sont
identiques à celles décrites dans l'exemple 2. Leurs
30 parties 3' sont pour l'une homologue à une partie de la
séquence connue. Pour l'autre, cette séquence est
constituée d'une série de nucléotides dégénérés.

Chacune de ces deux parties 3' est associée
indifféremment à l'une ou l'autre des parties 3'. Par
35 exemple, l'oligonucléotide dégénéré est associé à

l'oligonucléotide XhoI, tandis que l'oligonucléotide homologue à la partie connue de la séquence est associé à l'oligonucléotide EcoRI.

5. 3) Amplification par PCR.

Une PCR est réalisée en utilisant comme matrice un mélange d'ADN contenant le fragment d'ADN recherché, et de préférence l'ADN complémentaire ou génomique purifié à partir d'un tissu ou d'une lignée cellulaire dans lequel le
10 gène correspondant à la séquence recherchée est exprimé.

Le produit de cette PCR peut être observé par électrophorèse sur gel d'agarose. L'observation de bandes distinctes indique que la séquence recherchée a probablement été amplifiée.

15 Les quatrième, cinquième et sixième étapes sont identiques à celles décrites dans l'exemple 2.

A l'issue de cette série d'étapes, L'ADN plasmidique de certaines colonies bactériennes, sélectionné sur le critère de la présence d'une insertion d'ADN au
20 niveau du polylinker du vecteur, peut être séquencé. Cette séquence peut correspondre à la séquence recherchée.

Exemple 7 : Insertion d'une banque d'ADNc dans le plasmide pBM.1.

25 Dans cet exemple, il ne s'agit pas d'insérer un unique fragment d'ADN dans un vecteur clivé et purifié comme dans les exemples précédents, mais d'y insérer une banque d'ADN, c'est à dire un mélange hétérogène de
30 fragments d'ADN.

1) Préparation du vecteur.

La première étape est identique à celle décrite dans le deuxième exemple.

2) Préparation d'ADNc homologue à ses extrémités au plasmide clivé et purifié.

Après avoir extrait de l'ARNm d'un tissu ou d'une lignée cellulaire, un premier brin d'ADNc est synthétisé selon l'une des procédures classiques, en utilisant comme amorce un oligonucléotide composé de deux parties. La partie 3' de cet oligonucléotide est composée de plusieurs thymidines (entre 5 et 50, et de préférence environ 20). Cette partie 3' est destinée à s'hybrider sur la queue poly-A des ARNm. La partie 5' de cet oligonucléotide est homologue à l'extrémité EcoRI du plasmide pBM.1, et la débordé d'un nucléotide. En outre, en 5' de la partie 5' est ajoutée un site de restriction rare, (tel que SmaI).

Le second brin de l'ADNc est ensuite synthétisé selon l'une ou l'autre des techniques connues par l'homme du métier.

Des adaptateurs, constitués d'oligonucléotides double-brin sont liés à cet ADNc selon une procédure de ligation classique. Ces adaptateurs se liguent indifféremment du côté 5' et du côté 3' de l'ADNc.

Les ADNc ainsi obtenus sont ensuite digérés par l'enzyme SmaI, de façon à exciser spécifiquement l'adaptateur lié en 3', indésirable.

Une réaction combinée en chaîne est ensuite réalisée comme à l'étape 4 de l'exemple 2.

Le produit de cette réaction est ensuite transformé dans des bactéries compétentes en utilisant de préférence la technique de l'électroporation, connue pour donner une efficacité de transformation optimale.

Un échantillon de ce mélange de transformation peut être prélevé, déposé sur un milieu solide contenant de la Kanamycine, et étudié par exemple par PCR sur colonies, comme décrit dans l'exemple 2, de façon à estimer le titre

et la fréquence dans ce mélange de bactéries contenant un insert d'ADNc.

5 Cette banque d'ADNc est ensuite destinée à être
criblée par n'importe quelle technique connue de l'homme du
métier, et notamment par utilisation d'une sonde marquée ou
d'anticorps couplés.

REVENDECATIONS

1) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) on prépare une molécule d'acide nucléique double brin comprenant le fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur, et en 5' dudit fragment un premier acide nucléique étiquette comprenant une séquence nucléique complémentaire de l'extrémité 5' d'un des brins d'un vecteur clivé, et en 3' dudit fragment un second acide nucléique étiquette comprenant une séquence nucléique complémentaire de l'extrémité 3' du même brin dudit vecteur clivé,

b) on dénature ladite molécule d'acide nucléique et un vecteur clivé dont les extrémités 5' et 3' de l'un des brin sont complémentaires desdits premier et second acides nucléiques étiquettes,

c) on incube ladite molécule d'acide nucléique avec le vecteur clivé dont les extrémités 5' et 3' sont complémentaires des premier et second acides nucléiques étiquettes, dans des conditions permettant l'hybridation desdits premier et second acides nucléiques étiquettes sur le vecteur clivé,

d) on copie :

- d'une part, le vecteur clivé dans le sens 5' vers 3' à partir de l'extrémité 3' du second acide nucléique étiquette hybridé à l'extrémité 3' du vecteur clivé, et

- d'autre part, le fragment d'acide nucléique dans le sens 5' vers 3' à partir de l'extrémité 3' du vecteur clivé,

e) éventuellement on ligature :

- d'une part, l'extrémité 3' du brin néosynthétisé avec comme matrice le vecteur, avec

l'extrémité 5' du premier acide nucléique étiquette hybridé à l'extrémité 5' du vecteur clivé, et

- d'autre part, l'extrémité 3' du brin néosynthétisé avec comme matrice le fragment à insérer, avec l'extrémité 5' du vecteur clivé,

f) éventuellement on répète les étapes (b) à (e),

g) éventuellement, on transforme un hôte cellulaire pour sélectionner les vecteurs ayant intégré le fragment d'acide nucléique.

2) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon la revendication 1, caractérisée en ce que à l'étape (a) on prépare une molécule d'acide nucléique comprenant :

- le fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur,

- de part et d'autre dudit fragment, une molécule d'acide nucléique étiquette constituée d'une séquence nucléique, de l'ordre de 10 à 150 nucléotides et de préférence de l'ordre de 15 à 100 nucléotides, homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé, ladite séquence nucléique homologue étant éventuellement séparée du fragment d'acide nucléique à intégrer par au moins un nucléotide et de préférence entre 1 et de l'ordre de 130 nucléotides.

3) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon la revendication 2, caractérisée en ce que la séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé comprise dans l'acide nucléique étiquette est complémentaire d'une séquence du vecteur bordée par une Thymidine (T) en 3'.

4) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que chaque séquence nucléique homologue d'une extrémité du vecteur clivé, comprise dans l'acide nucléique étiquette, est suffisamment homologue pour s'hybrider à ladite extrémité du vecteur clivé à une température comprise entre 30 et 90°C, de préférence entre 30 et 70°C et tout préférentiellement à une température de 50°C.

5) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une des quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'étape (a) la molécule d'acide nucléique est préparée par amplification du fragment d'acide nucléique à insérer dans le vecteur par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir de deux oligonucléotides amorces comportant chacun une partie en 5' constituant l'acide nucléique étiquette, dont l'extrémité 3' de la séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé :

- soit se termine au niveau du dernier nucléotide dudit vecteur clivé, et alors l'acide nucléique étiquette est constitué seulement de ladite séquence homologue à l'extrémité du vecteur clivé,

- soit est plus longue d'au moins un nucléotide, et alors l'acide nucléique étiquette est constitué de ladite séquence homologue à l'extrémité du vecteur clivé, prolongé en 3' d'au moins un nucléotide.

6) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le vecteur est un vecteur plasmidique contenant avantageusement un

marqueur de résistance à un antibiotique, et qui est clivé au niveau d'un ou de deux sites de restriction.

5 7) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les étapes de copie (d) et de ligation (e) consiste à soumettre, après la dénaturation de l'étape (b) et l'hybridation de l'étape (c) la molécule d'acide nucléique préparé à l'étape (a) et le
10 vecteur clivé, à l'action d'une polymérase et d'une ligase thermostables.

15 8) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les étapes de copie (d) et de ligation (e) sont réalisées soit successivement soit sensiblement simultanément.

20 9) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que l'étape (d) est effectuée en présence d'oligonuclotides relais phosphorylés homologues de différentes parties du vecteur et répartis de façon homogène sur chacun des deux brins du
25 plasmide, à une distance entre eux de 500 à 2000 paires de bases.

30 10) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que à l'étape (a) la molécule d'acide nucléique est préparée par amplification du fragment d'acide nucléique à insérer dans le vecteur par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir de deux oligonucléotides amorces, chacun de
35 ces oligonucléotides étant composé de deux parties :

- une partie en 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer,

- une partie en 5', constituant l'acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

11) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon la revendication 10, caractérisée en ce que la partie 3' de chaque oligonucléotide amorce comprend de 5 à 20 nucléotides dont la séquence est suffisamment homologue à celle de chacune des extrémités du fragment d'acide nucléique pour s'hybrider à ladite extrémité à une température comprise entre 30 et 90°C, et de préférence environ 50°C.

12) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisée en ce que la partie 5' de chaque oligonucléotide amorce constituant l'acide nucléique étiquette comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé qui est complémentaire d'une séquence du vecteur bordée par une Thymidine (T) en 3'.

13) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que la partie 5' de chaque oligonucléotide amorce constituant l'acide nucléique étiquette est constituée d'une séquence nucléique, de l'ordre de 10 à 150 nucléotides et de préférence de l'ordre de 15 à 100 nucléotides, homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé, ladite séquence nucléique homologue étant éventuellement séparée de la partie en 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer par au moins un nucléotide et de préférence entre 1 et de l'ordre de 130 nucléotides.

14) Méthode d'insertion d'un fragment d'acide nucléique dans un vecteur selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisée en ce que la partie 5' de chaque oligonucléotide amorce constituant l'acide nucléique étiquette comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé qui est suffisamment homologue pour s'hybrider à ladite extrémité du vecteur clivé à une température comprise entre 30 et 90°C, de préférence entre 30 et 70°C et tout préférentiellement à une température de 50°C.

15) Un kit pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend les produits suivants, proposés séparément ou sous forme de mélange :

- un vecteur plasmidique clivé dans son polylinker au niveau d'un ou de préférence de deux sites non compatibles,

- une série d'oligonucléotides relais complémentaires de régions du vecteur,

- un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable,

- une polymérase thermostable possédant de préférence une activité exonucléasique additionnelle,

- une ligase thermostable,

- une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides.

- éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

16) Utilisation d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la fabrication de banques d'ADNc.

17) Un kit pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 appliquée à la fabrication de banque d'ADNc, caractérisé en ce qu'il comprend les produits suivants, proposés séparément ou sous
5 forme de mélange :

- un vecteur plasmidique, clivé dans son polylinker au niveau d'un ou de préférence de deux sites non compatibles,

10 - une série d'oligonucléotides relais complémentaires de régions du vecteur,

- un oligonucléotide nécessaire à la synthèse du premier brin,

15 - deux oligonucléotides homologues à chacun des brins de l'une des extrémités du vecteur clivé, susceptibles d'être ajoutés en tant qu'adaptateurs à l'ADNc une fois celui-ci synthétisé,

- un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable,

20 - une polymérase thermostable possédant de préférence une activité exonucléasique additionnelle,

- une ligase thermostable,

- une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides.

25 - éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

18) Utilisation d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour insérer un
30 fragment d'acide nucléique inconnu ou hétérogène dans un vecteur.

19) Utilisation d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la recherche des
35 extrémités 5' d'une séquence d'acide nucléique.

20) Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que les deux oligonucléotides amorces mis en œuvre pour la préparation de la molécule d'acide nucléique de l'étape (a) sont composés chacun de deux parties :

- une partie en 3' dégénérée de façon à être homologue de plusieurs séquences d'acides nucléiques, et
- une partie en 5', constituant l'acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

21) Un kit pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 appliquée à la recherche des extrémités 5' d'une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend les produits suivants, proposés séparément ou sous forme de mélange :

- un vecteur plasmidique, clivé dans son polylinker au niveau d'un ou de préférence de deux sites non compatibles,
- une série d'oligonucléotides relais complémentaires de régions du vecteur,
- deux oligonucléotides composés chacun de deux parties :
 - une partie en 3' dégénérée de façon à être homologue de plusieurs séquences d'acides nucléiques, et
 - une partie en 5', constituant l'acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.
- un tampon compatible avec l'activité simultanée d'une polymérase thermostable et d'une ligase thermostable,
- une polymérase thermostable possédant de préférence une activité exonucléasique additionnelle,
- une ligase thermostable,

- une quantité suffisante de chacun des quatre désoxyribo-nucléotides.

- éventuellement, de bactéries compétentes aptes à être transformées.

5

22) Un oligonucléotide constituant une amorce pour la préparation par PCR d'une molécule d'acide nucléique contenant un fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur, susceptible d'être utilisé dans une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que chacun ledit oligonucléotide est composé de deux parties :

10

- une partie en 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer,

15

- une partie en 5', constituant un acide nucléique étiquette, comprenant une séquence nucléique homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé.

20

23) Un oligonucléotide selon la revendication 22, caractérisé en ce que la partie 3' comprend de 5 à 20 nucléotides dont la séquence est suffisamment homologue à celle d'une extrémité du fragment d'acide nucléique pour s'hybrider à ladite extrémité à une température comprise entre 30 et 90°C, et de préférence environ 50°C.

25

24) Un oligonucléotide selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisé en ce que la partie 5' constituant l'acide nucléique étiquette comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité d'un vecteur clivé qui est complémentaire d'une séquence du vecteur bordée par une Thymidine (T) en 3'.

30

25) Un oligonucléotide selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que la partie 5' constituant l'acide nucléique étiquette est constituée

35

d'une séquence nucléique, de l'ordre de 10 à 150 nucléotides et de préférence de l'ordre de 15 à 100 nucléotides, homologue à l'une des extrémités d'un vecteur clivé, ladite séquence nucléique homologue étant éventuellement séparée de la partie en 3' homologue à une extrémité du fragment à insérer par au moins un nucléotide et de préférence entre 1 et de l'ordre de 130 nucléotide.

26) Un oligonucléotide selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce que la partie 5' constituant l'acide nucléique étiquette comprend une séquence nucléique homologue de l'extrémité du vecteur clivé qui est suffisamment homologue pour s'hybrider à ladite extrémité du vecteur clivé à une température comprise entre 30 et 90°C, de préférence entre 30 et 70°C et tout préférentiellement à une température de 50°C.

27) Une paire d'amorce utile pour une réaction d'amplification par PCR d'un fragment d'acide nucléique à insérer dans un vecteur clivé caractérisée en ce qu'elle est constituée de deux oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 22 à 26.

28) Un produit d'amplification obtenu par une réaction PCR mise en œuvre avec une paire d'amorces selon la revendication 27.

1/4

Fig. 1

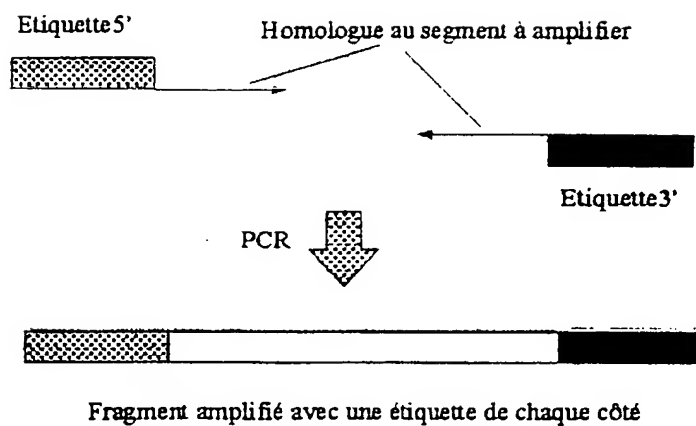
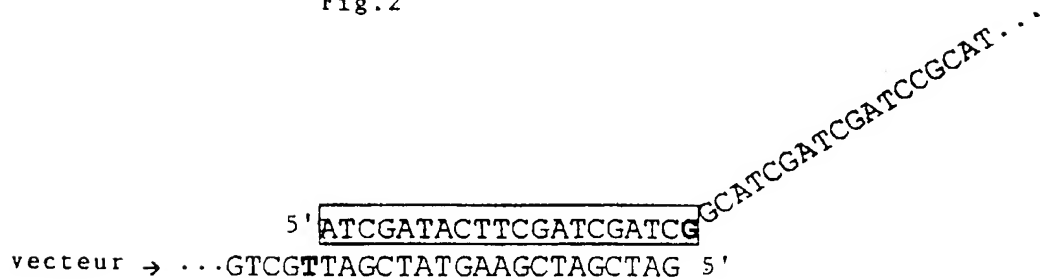
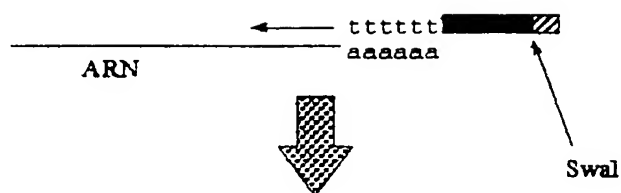


Fig. 2

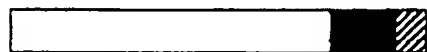


2 / 4

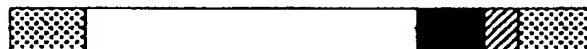
Synthèse du premier brin



Synthèse du second brin



Ajout des adaptateurs



Clivage Swal

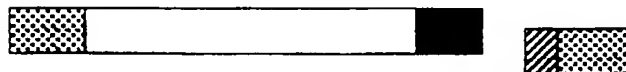
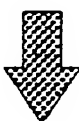


Figure 3

4 / 4

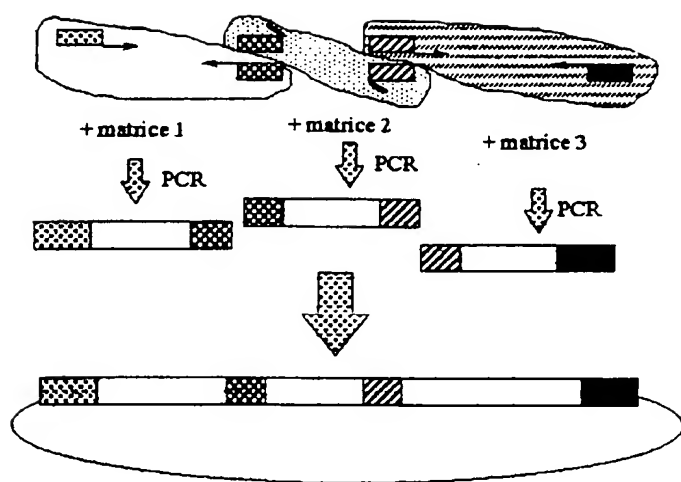
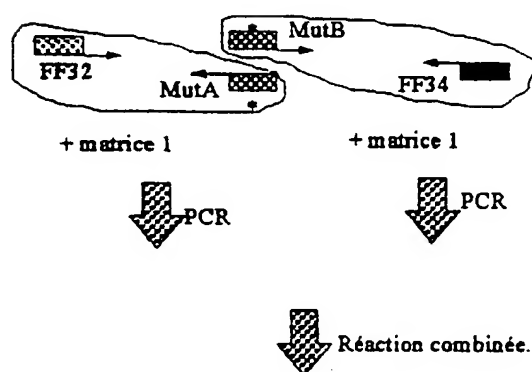


Figure 5.



* : mutation

Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No
PCT/FR 00/01349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/66 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | MCCRACKEN A A ET AL: "An enrichment selection for mutants resulting from oligonucleotide- directed mutagenesis of double-stranded DNA." BIOTECHNIQUES, (1988 APR) 6 (4) 332-9., vol. 6, no. 4, April 1988 (1988-04), pages 332-339, XP002129939 | 1-4,6,8, 16,18-20 |
| Y | * Figure 1 * | 5,7, 9-16,19 |
| X | WO 91 07505 A (DYNAL AS) 30 May 1991 (1991-05-30) cited in the application | 22-28 |
| Y | figures 1,2; example 2 page 4, paragraph 3 -page 10 claim 1 | 5,10-14 |
| | --- -/-- --- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 2000

Date of mailing of the international search report

02/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG., A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/FR 00/01349

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | TEMESGEN B ET AL: "Simplified method for ligase-free cloning of PCR products." BIOTECHNIQUES, vol. 21, no. 5, November 1996 (1996-11), page 828,830,832 XP000867540 | 22-28 |
| A | figure 1 | 1-21 |
| X | SHULDINER A R ET AL: "PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 7, 11 April 1990 (1990-04-11), page 1920 XP000867585 | 22-28 |
| A | the whole document | 1-21 |
| X | JONES D H ET AL: "A rapid method for site-specific mutagenesis and directional subcloning by using the polymerase chain reaction to generate recombinant circles." BIOTECHNIQUES, vol. 8, no. 2, February 1990 (1990-02), pages 178-183, XP000874253 | 22-28 |
| A | page 180; figure 3 | 1-21 |
| Y | CHEN Z ET AL: "Amplification of closed circular DNA in vitro 'corrected and republished with original paging, article originally printed in Nucleic Acids Res 1998 Feb 15;26(4):1126-7!." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 23, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 1126-1127, XP002122693 the whole document | 7,15 |
| Y | WO 98 15567 A (KONCZ CSABA ;SCHELL JEFF (DE); STRIZHOV NICOLAI (DE); VITALITY BIO) 16 April 1998 (1998-04-16) * revendications * | 9 |
| Y | CHENCHIK A ET AL: "FULL-LENGTH CDNA CLONING AND DETERMINATION OF MRNA 5' AND 3' ENDS BY AMPLIFICATION OF ADAPTOR-LIGATED CDNA" BIOTECHNIQUES,US,EATON PUBLISHING, NATICK, vol. 21, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 526-534, XP000635197 ISSN: 0736-6205 figure 1 * MATHERIALS AND METHODS * | 16,19 |
| | --- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int .tional Application No

PCT/FR 00/01349

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | GAL J ET AL: "Directional cloning of native PCR products with preformed sticky ends (autosticky PCR)." MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 260, no. 6, January 1999 (1999-01), pages 569-573, XP000867543 ----- | |
| A | AILENBERG M ET AL: "Description of a one step staggered reannealing method for directional cloning of PCR-generated DNA using sticky-end ligation without employing restriction enzymes." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 39, no. 4, July 1996 (1996-07), pages 771-779, XP000874172 ----- | |
| A | US 5 523 221 A (WEINER MICHAEL P) 4 June 1996 (1996-06-04) ----- | |
| A | WO 97 42330 A (APOLLON INC) 13 November 1997 (1997-11-13) ----- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. rtional Application No

PCT/FR 00/01349

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO 9107505 A | 30-05-1991 | AT 106949 T AU 645045 B AU 6740390 A CA 2066663 A DE 69009774 D DE 69009774 T EP 0502011 A JP 5501498 T US 5525493 A | 15-06-1994 06-01-1994 13-06-1991 22-05-1991 14-07-1994 27-10-1994 09-09-1992 25-03-1993 11-06-1996 |
| WO 9815567 A | 16-04-1998 | AU 4635497 A AU 4635597 A EP 0948626 A EP 0935603 A WO 9815630 A US 6110668 A US 6043415 A | 05-05-1998 05-05-1998 13-10-1999 18-08-1999 16-04-1998 29-08-2000 28-03-2000 |
| US 5523221 A | 04-06-1996 | NONE | |
| WO 9742330 A | 13-11-1997 | US 5851804 A AU 711882 B AU 2937097 A AU 711110 B AU 2998697 A EP 0938337 A EP 0960205 A WO 9741892 A | 22-12-1998 21-10-1999 26-11-1997 07-10-1999 26-11-1997 01-09-1999 01-12-1999 13-11-1997 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : de internationale No

PCT/FR 00/01349

| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/66 C12Q1/68 | | |
|---|---|--|
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C12Q | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| X | MCCRACKEN A A ET AL: "An enrichment selection for mutants resulting from oligonucleotide- directed mutagenesis of double-stranded DNA." BIOTECHNIQUES, (1988 APR) 6 (4) 332-9., vol. 6, no. 4, avril 1988 (1988-04), pages 332-339, XP002129939 | 1-4,6,8, 16,18-20 |
| Y | * Figure 1 * | 5,7, 9-16,19 |
| X | WO 91 07505 A (DYNAL AS) 30 mai 1991 (1991-05-30) cité dans la demande | 22-28 |
| Y | figures 1,2; exemple 2 page 4, alinéa 3 -page 10 revendication 1 | 5,10-14 |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe | | |
| * Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 22 septembre 2000 | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 02/10/2000 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé ALCONADA RODRIG..., A |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D de Internationale No

PCT/FR 00/01349

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| X | TEMESGEN B ET AL: "Simplified method for ligase-free cloning of PCR products." BIOTECHNIQUES, vol. 21, no. 5, novembre 1996 (1996-11), page 828,830,832 XP000867540 figure 1 | 22-28 |
| A | --- | 1-21 |
| X | SHULDINER A R ET AL: "PCR-induced (ligase-free) subcloning: a rapid reliable method to subclone polymerase chain reaction (PCR) products." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 7, 11 avril 1990 (1990-04-11), page 1920 XP000867585 | 22-28 |
| A | le document en entier | 1-21 |
| X | JONES D H ET AL: "A rapid method for site-specific mutagenesis and directional subcloning by using the polymerase chain reaction to generate recombinant circles." BIOTECHNIQUES, vol. 8, no. 2, février 1990 (1990-02), pages 178-183, XP000874253 page 180; figure 3 | 22-28 |
| A | --- | 1-21 |
| Y | CHEN Z ET AL: "Amplification of closed circular DNA in vitro 'corrected and republished with original paging, article originally printed in Nucleic Acids Res 1998 Feb 15;26(4):1126-7!." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 23, 1 décembre 1998 (1998-12-01), pages 1126-1127, XP002122693 le document en entier | 7,15 |
| Y | WO 98 15567 A (KONCZ CSABA ;SCHELL JEFF (DE); STRIZHOV NICOLAI (DE); VITALITY BIO) 16 avril 1998 (1998-04-16) * revendications * | 9 |
| Y | CHENCHIK A ET AL: "FULL-LENGTH CDNA CLONING AND DETERMINATION OF MRNA 5' AND 3' ENDS BY AMPLIFICATION OF ADAPTOR-LIGATED CDNA" BIOTECHNIQUES,US,EATON PUBLISHING, NATICK, vol. 21, no. 3, 1 septembre 1996 (1996-09-01), pages 526-534, XP000635197 ISSN: 0736-6205 figure 1 * MATERIALS AND METHODS * | 16,19 |
| | --- | |

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De ide Internationale No

PCT/FR 00/01349

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | GAL J ET AL: "Directional cloning of native PCR products with preformed sticky ends (autosticky PCR)." MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 260, no. 6, janvier 1999 (1999-01), pages 569-573, XP000867543 ----- | |
| A | AILENBERG M ET AL: "Description of a one step staggered reannealing method for directional cloning of PCR-generated DNA using sticky-end ligation without employing restriction enzymes." BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 39, no. 4, juillet 1996 (1996-07), pages 771-779, XP000874172 ----- | |
| A | US 5 523 221 A (WEINER MICHAEL P) 4 juin 1996 (1996-06-04) ----- | |
| A | WO 97 42330 A (APOLLON INC) 13 novembre 1997 (1997-11-13) ----- | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Office International No

PCT/FR 00/01349

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 9107505 A | 30-05-1991 | AT 106949 T | 15-06-1994 |
| | | AU 645045 B | 06-01-1994 |
| | | AU 6740390 A | 13-06-1991 |
| | | CA 2066663 A | 22-05-1991 |
| | | DE 69009774 D | 14-07-1994 |
| | | DE 69009774 T | 27-10-1994 |
| | | EP 0502011 A | 09-09-1992 |
| | | JP 5501498 T | 25-03-1993 |
| | | US 5525493 A | 11-06-1996 |
| WO 9815567 A | 16-04-1998 | AU 4635497 A | 05-05-1998 |
| | | AU 4635597 A | 05-05-1998 |
| | | EP 0948626 A | 13-10-1999 |
| | | EP 0935603 A | 18-08-1999 |
| | | WO 9815630 A | 16-04-1998 |
| | | US 6110668 A | 29-08-2000 |
| | | US 6043415 A | 28-03-2000 |
| US 5523221 A | 04-06-1996 | AUCUN | |
| WO 9742330 A | 13-11-1997 | US 5851804 A | 22-12-1998 |
| | | AU 711882 B | 21-10-1999 |
| | | AU 2937097 A | 26-11-1997 |
| | | AU 711110 B | 07-10-1999 |
| | | AU 2998697 A | 26-11-1997 |
| | | EP 0938337 A | 01-09-1999 |
| | | EP 0960205 A | 01-12-1999 |
| | | WO 9741892 A | 13-11-1997 |